

DISEÑO RACIONAL DE VARIANTES DE CITOCROMO *c* RESISTENTES A LA INACTIVACION POR PEROXIDO DE HIDROGENO

Brenda Valderrama, Humberto García y Rafael Vázquez-Duhalt. Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 510-3 Cuernavaca, Morelos, México.

brenda@ibt.unam.mx

Palabras clave: *ingeniería de proteínas, daño oxidativo, catálisis*

Introducción. Las peroxidasas son muy sensibles a oxidarse en presencia de concentraciones catalíticas de peróxido de hidrógeno, uno de sus sustratos. Durante el ciclo catalítico de las peroxidasas el átomo de hierro del grupo hemo es oxidado por el peróxido de hidrógeno para formar un radical catiónico el cuál es reducido dos veces por el sustrato hasta regenerar el cofactor. Ocasionalmente el hierro es oxidado de nuevo durante el ciclo generando una variante inestable del cofactor, llamada compuesto III. La formación del compuesto III provoca la destrucción del hemo y la oxidación irreversible de la enzima (1,2). La inactivación suicida de las peroxidasas disminuye notablemente su vida útil siendo la principal limitante para su uso generalizado en procesos industriales (3).

Aquí presentamos la caracterización cinética del proceso de destrucción oxidativa del citocromo *c* y el efecto de mutaciones sitio-dirigidas diseñadas a partir de esta caracterización.

Metodología. Todo el trabajo se realizó con el citocromo *c* de levadura recombinante. Se evaluaron tres diferentes parámetros de daño oxidativo después de incubar la proteína con peróxido de hidrógeno 1mM: Actividad residual, medida como la capacidad de la proteína de oxidar el sustrato azul de pinacianol en presencia de 10% de acetonitrilo. Coordinación axial del hierro por la metionina 80, evaluada cuantificando la banda espectrofotométrica a 695nm. Integridad del grupo hemo, seguida a través de la desaparición de la banda espectrofotométrica Soret a 410 nm. En todos los casos la evolución del parámetro siguió una cinética de primer orden.

Resultados y Discusión. La exposición del citocromo *c* a concentraciones catalíticas de peróxido de hidrógeno en ausencia de otros sustratos produce su inactivación irreversible. Nosotros hemos demostrado previamente que una doble sustitución en las posiciones 52 y 67 protegen al citocromo *c* de levadura de la destrucción del hemo pero no de la inactivación (4). Como puede verse en el Cuadro I, en la proteína silvestre la pérdida de coordinación axial es seguida por la inactivación y ésta por la destrucción del hemo. En la doble mutante I52N,Y67F hay una correlación directa entre la prolongada integridad del grupo hemo y la preservación de la coordinación axial, aunque sufre una disminución significativa de su actividad catalítica comparada con la proteína silvestre. Existen evidencias que indican que la inactivación oxidativa de peroxidasas puede ser producto de la translocación de especies reactivas a través de la proteína hasta alcanzar residuos sensibles, donde

el radical libre se estabiliza (5). Los primeros residuos de éste túnel deben encontrarse dentro del sitio activo cerca del grupo hemo, probablemente triptofanos, ya que son altamente capaces de estabilizar radicales libres (5). Existe un solo residuo de triptofano en el citocromo *c*, localizado en la posición 59, en la vecindad del hemo y de los residuos 52 y 67. La sustitución del triptofano 59 por alanina suprimió el efecto protector de las mutaciones I52N,Y67F. En contraste, la sustitución por fenilalanina, un residuo capaz de estabilizar radicales libres aunque menos que el triptofano, produjo una enzima híbrida la cuál preserva el efecto protector de las mutaciones I52N,Y67F pero recobra el perfil catalítico de la enzima silvestre.

Cuadro 1. Estabilidad y parámetros catalíticos de variantes del citocromo c de levadura

	Silvestre	I52N, Y67F	I52N, Y67F, W59A	I52N, Y67F, W59F
Vida media (min)				
Coordinación axial	3	>700	0,7	>360
Actividad	5	2	0,17	0,17
Señal Soret	8,5	7000	7	1400
k_{cat} (min ⁻¹)	160	2,5	600	370
K_M por H ₂ O ₂ (mM)	90	8,5	13	5
k_{cat}/K_M (mM min ⁻¹)	18,5	0,3	46	75

Conclusiones. Aunque todavía tenemos el reto de aumentar la vida media de la actividad catalítica, estos resultados indican que el análisis formal del proceso de inactivación oxidativa de las peroxidasas produce información valiosa para el diseño racional de variantes más estables.

Agradecimientos. A Raunel Tinoco y Rosa Román por su asistencia técnica. Al Instituto Mexicano del Petróleo por su financiamiento IMP-FIES 48-110-VI

Bibliografía.

- Nagababu, E. y Rifkind, J.M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:839-845
- Schussel, L.J. y Atwater, J.E. (1996) *Enzyme Microb. Technol.* 18:229-235.
- Vázquez-Duhalt, R. (1999) *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 7:241-249.
- Villegas, J.A., Mauk, A.G. y Vázquez-Duhalt, R. (2000) *Chem. Biol.* 7:237-244.
- Davies, M.J. y Dean, R.T. (1997) En: *Radical-mediated protein oxidation.* Oxford Science Publications.